



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	真核生物における翻訳アレストに関する研究 : 植物の小胞体ストレス応答に関与する翻訳アレストの解析および翻訳アレストの定量的解析[全文の要約]
Author(s)	今道, 朋哉
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15763号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92620
Type	doctoral thesis
File Information	IMAMICHI_Tomoya_summary.pdf



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 今 道 朋 哉

学 位 論 文 題 名

真核生物における翻訳アレストに関する研究

—植物の小胞体ストレス応答に関与する翻訳アレストの解析および翻訳アレストの定量的解析—

【背景】

翻訳装置であるリボソームによって合成された新生ペプチドは、リボソーム大サブユニットの出口トンネルを通過してリボソームの外側へと出てくる。タンパク質は生命活動の大部分を担うが、翻訳が完了し、折りたたまれて初めて機能するものと考えられてきた。しかしながら、近年、合成途上でリボソーム出口トンネルに働きかけて翻訳の停滞（アレスト）を誘導する「アレストペプチド」の存在が明らかにされてきた。アレストペプチドは原核・真核生物を問わず報告されており、それらは様々な生物学的プロセスに関与している。

アレストペプチドの中でも、哺乳類の小胞体ストレス応答に関与する XBP1u は、それ自身をコードする mRNA の細胞内局在を調節するという点でユニークである。外的あるいは内的な要因により小胞体内腔に折りたたみ不良のタンパク質が蓄積すると、小胞体膜を貫通するセンサータンパク質によって小胞体内腔の異常が核へと伝えられ、特定の遺伝子群の転写を誘導することで小胞体ストレス応答が惹起される。小胞体ストレスセンサーの 1 つである IRE1 は、小胞体ストレス下で活性化することによって、細胞質に存在する基質 mRNA のスプライシングを行う。哺乳類では、細胞質スプライシングにより、*XBPIu* mRNA の読み枠が変わり、小胞体ストレス応答を惹起する転写因子をコードするようになる。IRE1 によるスプライシングが効率良く起こるためには、*XBPIu* mRNA が小胞体膜近傍に局在する必要がある。*XBPIu* タンパク質の C 末端側には、疎水性領域がコードされており、この領域が合成されてリボソーム出口トンネルから出たところで翻訳アレストが起こる。これにより、シグナル認識粒子が XBP1u 新生ペプチドの疎水性領域を認識できるようになり、翻訳の中間体が維持された状態で *XBPIu* mRNA が小胞体膜近傍へと運ばれる。

シロイヌナズナにおいては、細胞質スプライシングの基質として *AtbZIP60u* が同定された。*AtbZIP60u* のドメイン構造は XBP1u とは異なり、アミノ酸配列も保存されていないものの、C 末端側に疎水性領域をもつ。このことから、本研究では、*AtbZIP60u* mRNA においても翻訳アレストが起こるという作業仮説を立て、その検証を行った。

また、真核生物において、XBP1u や *AtbZIP60u*（オルソログ）はストレス応答に関与するが、これら以外のアレストペプチドは細胞内の恒常性維持あるいはウイルスの遺伝子発現制御に関与する。このようにアレストペプチドごとに司る生物学的プロセスが異なることに鑑みると、その定量的性質がそれぞれに最適化されていると期待される。そこで、翻訳アレストの定量的解析法を確立し、それらの定量的性質と生物学的意義との関係を考察した。

1. *AtbZIP60* mRNA における翻訳アレストの解析

AtbZIP60 mRNA において、翻訳アレストが起こるかどうかを検証するため、コムギ胚芽由来の無細胞翻訳系において *AtbZIP60u* mRNA（非スプライシング型 RNA）および *AtbZIP60s* mRNA（スプライシング型 RNA）を翻訳した。これらの翻訳産物をウェスタン解析に供したところ、*AtbZIP60u* mRNA を翻訳した場合に翻訳アレスト産物であるペプチジル-tRNA が検出された。次に、*AtbZIP60u* mRNA のタンパク質コード領域を N 末端側から徐々に欠失させた系列を用いて、ペプチジル-tRNA の蓄積レベルを野生型と比較することで、翻訳アレストが起こる位置を絞り込んだ。

その結果、AtbZIP60u の N 末端から 261 番目以降のアミノ酸配列をコードするコンストラクトでは、ペプチジル-tRNA の蓄積レベルに関して野生型と有意な差が認められず、当該領域が翻訳アレストの必要十分領域であることを明らかにした。続けて行った終止コドン導入系列を用いたストップコドンスキニング解析では、N 末端から 287 番目のリジンをコードするコドン (Lys-287) よりも下流のコドンをそれぞれ終止コドンに置換した場合には差は見られなかった。一方、Lys-287 やそれよりも上流のコドンを終止コドンに置換した場合、ペプチジル-tRNA の蓄積レベルが野生型よりも低下した。この結果から、*AtbZIP60u* mRNA の Lys-287 において翻訳アレストが起こることを示した。これまで同定されてきたアレストペプチドは、ペプチド結合形成の活性中心であるペプチジルトランスフェラーゼセンター (PTC) の機能を阻害することで翻訳アレストを誘導することが知られている。アミノアシル-tRNA アナログであるピューロマイシンは、PTC に入り込み、ペプチジル-ピューロマイシンとしてリボソームから解離する。ピューロマイシンを反応系に加えたところ、Lys-287 におけるペプチジル-tRNA は、終止コドンにおいて蓄積するペプチジル-tRNA よりもリボソームから解離する割合が少なかった。このことから、AtbZIP60u における翻訳アレストが誘導される際には、PTC の機能が阻害されていることを明らかにした。さらに、AtbZIP60u のアミノ酸残基を側鎖の特徴が少ないアラニンに 1 つずつ置換したコンストラクトを用いて、ペプチジル-tRNA の蓄積レベルを調べることにより、AtbZIP60u のアレストペプチドは、277-RRCKxxRxRMK-287 であることを示した。また、同定された翻訳アレストに重要なアミノ酸残基は、種子植物間で高度に保存されていた。

2. 植物の bZIP60 オルソログにおける翻訳アレストの解析

細胞質スプライシングは、シロイヌナズナ以外の植物においても報告されている。系統間での翻訳アレストの保存性を明らかにするため、既報の bZIP60 オルソログに加え、多様な種におけるオルソログを用いて翻訳アレストが起こるかどうかを検証した。その結果、イネの *OsbZIP50u* およびヒメツリガネゴケの *PpbZIP60Lu* においては翻訳伸長段階で翻訳アレストが誘導されることを明らかにした。次に、翻訳アレストを誘導する bZIP60 オルソログについて、上記の AtbZIP60 と同様の解析を行った。*OsbZIP50u* では、AtbZIP60u とアレスト位置が一致しており、アレストペプチドも保存されていた。一方、*PpbZIP60Lu* においては AtbZIP60u とアレスト位置が異なっており、アレストペプチドの保存性も見られなかった。さらに、翻訳アレストは、イヌカタヒバ (小葉シダ) の *SmbZIP50u* でも起こることを発見した。ただし、*SmbZIP50u* の翻訳アレストは翻訳終結段階で誘導され、プロリン-プロリン-終止コドンというモチーフがアレストに重要であった。他方、ゼニゴケや藻類の bZIP60 オルソログにおいては、翻訳アレスト産物は検出されなかった。翻訳アレストを誘導しなかった bZIP60 オルソログにおいては、bZIP ドメインよりも下流の領域がコードするアミノ酸配列が長く、疎水性領域が複数存在するという特徴が見られた。したがって、これらのオルソログでは、mRNA の翻訳中にリボソームが停滞することなく、疎水性領域とシグナル認識粒子が相互作用するのに十分な機会があるという可能性が考えられた。

上記の解析に加え、bZIP60 オルソログにおける翻訳アレストと細胞質スプライシングの関係も調べた。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に、*AtbZIP60u*、*SmbZIP50u*、*PpbZIP60Lu* の bZIP ドメインよりも下流の領域を持つプラスミドをそれぞれ作製した。野生型のプラスミドおよびアレストペプチドの変異を導入したプラスミドをそれぞれシロイヌナズナ培養細胞 MM2d にトランスフェクションし、ツニカマイシンを加えることで小胞体ストレスを誘導した。当初は逆転写-PCR によって細胞質スプライシング効率の測定を試みたが、スプライシング型と非スプライシング型のヘテロダイマーが検出されたため、この方法は断念した。そこで、スプライシング型と非スプライシング型それぞれに対して特異的なプライマーを設計し、定量 PCR を行った。その結果、*AtbZIP60u* と *SmbZIP50u* の変異型プラスミドを導入した場合において、スプライシング型 mRNA の有意な減少が認められた。これらの結果より、翻訳アレストは細胞質スプライシングの効率的な誘導に寄与していることを示した。以上の内容は *Nucleic Acids Research* 誌に掲載された (<https://doi.org/10.1093/nar/gkae101>)。

3. 翻訳アレストの定量的解析

翻訳反応はいくつもの素反応から構成されており、このような複雑系から翻訳アレストに関わる反応に絞って定量することは現段階では困難である。そこで、数理モデルを利用した解析が有

効であると考えた。まず、コムギ胚芽由来の無細胞翻訳系を用いて、一定時間のみ翻訳開始反応を行い、その後の翻訳産物の蓄積量の経時変化を調べるパルス翻訳系を確立した。次に、パルス翻訳系の数理モデルを検討した。翻訳アレストの定量的性質は、翻訳を開始したリボソームのうち、翻訳アレストが起こるものの割合 (x) と翻訳アレストの半減期 (τ_{AF}) からなると考えた。これらのパラメータに加え、翻訳アレストが起こったまま翻訳が再開しない中途終了型の翻訳産物を仮定することで、最適と考えられるモデルを導き出した。

確立した翻訳アレストの定量的解析法を用いて、真核生物におけるアレストペプチドの定量的性質を調べたところ、翻訳アレストの半減期はウイルスの遺伝子発現制御に関わるもので長く、細胞内の恒常性維持に関わるもので短い傾向が見られた。一方で、翻訳アレストが起こる割合はほぼ 1 となる傾向が見られた。AtbZIP60u が誘導する翻訳アレストの半減期は約 5 分であり、*AtbZIP60u* mRNA が細胞質スプライシングを受けるために必要十分な時間であることが示唆された。また、一部のアレストペプチドは、特定の低分子化合物（エフェクター）に応答して翻訳アレストを誘導することで、当該化合物のフィードバック制御を司っている。このようなエフェクター依存型の翻訳アレストにおいて、エフェクター濃度と定量的性質の関係を調べたところ、エフェクター濃度の上昇と平行して翻訳アレストの半減期が長くなる一方で、翻訳アレストが起こる割合はエフェクター濃度に依存せず 1 となる傾向が見られた。

以上、本研究により、小胞体ストレス応答に応答した bZIP60u（オルソログ）の細胞質スプライシングに翻訳アレストが関与すること、アレストペプチドが司る生物学的プロセスと翻訳アレストの半減期が密接に関係していることが見出された。今後、基質 mRNA における翻訳アレストに依らない小胞体近傍へのターゲティング機構を調べることにより、植物における細胞質スプライシングの進化の全体像についての理解が深まることが期待される。